

C2C12 근원세포에서 산화적 스트레스 유발 세포 독성에 대한 머루근 추출물의 보호 효과

정수은* · 조성우* · 박송미* · 최영현†

동의대학교 한방병원 한방재활의학과*, 동의대학교 생화학교실†

Protective Effect of Root of *Vitis Amurensis* Extract Against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in C2C12 Myogenic Cells

Su-Eun Jung, K.M.D.*, Sung-Woo Cho, K.M.D.*, Song-Mi Park, K.M.D.*, Yung-Hyun Choi, Ph.D.†

Department of Korean Medicine Rehabilitation, Dong-Eui University Korean Medicine Hospital*, Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University†

Objectives This study evaluated the protective effects of water extract of *Vitis amurensis* root (WEVA) against hydrogen peroxide H_2O_2 -induced oxidative damage in C2C12 myoblasts.

Methods To evaluate the protective effects of WEVA, C2C12 myoblasts were treated with H_2O_2 in the presence or absence of WEVA. The effects on cell viability, reactive oxygen species (ROS) generation, DNA damage, apoptosis, and mitochondrial function were analyzed using specific biochemical assays and western blotting. The involvement of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway was further investigated using a specific HO-1 inhibitor.

Results Our results demonstrated that WEVA protected against H_2O_2 -induced reduction in cell viability and DNA damage, while simultaneously inhibiting the production of ROS. WEVA attenuated H_2O_2 -induced apoptosis in C2C12 cells by increasing the Bcl-2/Bax expression ratio, inhibiting caspase-3 activation, and blocking the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. Furthermore, WEVA reduced the release of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol by preventing mitochondrial membrane disruption in H_2O_2 -treated C2C12 cells. Under oxidative stress, WEVA enhanced the expression and activity of HO-1, a process mediated by the induction and phosphorylation of Nrf2. However, the ROS scavenging and cytoprotective effects of WEVA were significantly diminished by an HO-1 inhibitor, indicating that WEVA prevents oxidative damage in C2C12 myoblasts by promoting Nrf2-mediated HO-1 activity.

Conclusions In conclusion, these findings suggest that WEVA, as an Nrf2 activator, possesses ROS scavenging capabilities and holds potential for protecting against oxidative stress-mediated muscle diseases. (*J Korean Med Rehabil* 2026;36(3):1-14)

RECEIVED June 4, 2026

REVISED June 26, 2026

ACCEPTED June 29, 2026

CORRESPONDING TO

Sung-Woo Cho, Department of
Korean Medicine Rehabilitation,
Dong-Eui University Korean
Medicine Hospital, 62
Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan
47227, Korea

TEL (051) 850-8671

FAX (051) 867-5162

E-mail luxy@daum.net

Copyright © 2026 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Key words Vitis, Myoblasts, NF-E2-related factor 2, Antioxidant, Mitochondrial dysfunction

서론»»»

세포 항상성 제어 시스템의 주요 신호 매개체인 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 통상적으로 세포 내에서 적정 농도로 제어되며 생리적 조절자 역할을 수행한다. ROS의 과도한 축적은 산화 환원 불균형과 손상된 항산화 방어 시스템에 의한 산화 스트레스(oxidative stress)로 정의되는 DNA, 지질, 단백질 및 세포 내 소기관에 비가역적인 산화 손상을 일으켜 궁극적으로 세포의 죽음을 초래한다^{1,2)}. 또한, 과잉 생산된 ROS는 미토콘드리아 기능 장애의 특징 중 하나인 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 감소시킨다. 이로 인하여 cytochrome *c*와 같은 미토콘드리아의 내막과 외막 사이에 존재하는 세포사멸(apoptosis) 유도 인자가 세포질로 방출되고 caspase cascade가 활성화되어 세포사멸 신호를 개시한다^{3,4)}. 특히, 골격근 세포는 다른 세포보다 산소를 많이 소비하여 수축 활동에 따라 미토콘드리아의 과활성화에 의해 ROS의 생산을 더욱 증가시킨다^{5,6)}. ROS 축적에 따라 산화 스트레스가 증가하면 근육 단백질 분해를 촉진하는데, 이는 근육 위축에 따른 근 손상을 일으킨다. ROS는 이 과정을 조절하는 여러 신호 경로의 중요한 활성자로서 작용한다^{7,8)}. 그러므로 정상적인 세포 기능 유지를 위해 세포 내 항산화제 시스템이나 외인성 항산화제를 통해 ROS 농도를 제어하는 것은, 근육 기능을 보호하는 유용한 전략이 될 수 있다.

왕머루(*Vitis amurensis* Rupr.)는 갈매나무목(Rhamnales order)의 포도과(葡萄科, Vitaceae family)에 속하는 다년생 덩굴성 목본에 속한다⁹⁾. 왕머루의 뿌리와 줄기는 복통, 신경통, 중풍, 암 등의 치료를 위해 전통 약재로 널리 사용되고 있으며, 수용성 당, 단백질, 비타민 및 2차 대사산물이 매우 풍부한 것으로 보고되고 있다^{10,11)}. 그동안 축적된 연구에 따르면 왕머루의 열매 또한 뿌리, 줄기와 함께 항산화¹²⁻¹⁶⁾ 효과 등이 있음이 밝혀졌다.

왕머루의 항산화 활성은 ROS 생성의 차단을 통하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 밝혀졌다. 왕머루의 뿌리인 머루근의 항산화 활성에 관한 Choi 등¹⁷⁾의 연구에 의하면, 머루근 추출물에 함유된 페놀 성분(phenolic compounds)에 의한 ROS 생성 차단

을 통한 미토콘드리아 기능 보존 능력이 인간 피부 각질세포(HaCaT keratinocytes)에서 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상과 세포사멸을 유의적으로 차단하였다. 그럼에도 불구하고 오랫동안 한약재로 널리 사용되고 있는 왕머루의 뿌리인 머루근의 항산화 활성 및 관련 기전에 대한 연구는 상대적으로 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 현재까지 연구가 이루어진 바 없는 근육에서 머루근의 항산화 활성에 관한 추가적인 효능 평가를 시도하였다. 본 연구에서는 세포 내 산화 스트레스 환경을 재현하고자 C2C12 근원세포(mouse myogenic cell line)에 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)를 처리하여 ROS 생성을 유도하였으며, 이를 기반으로 머루근 수용성 추출물(water extract of *Vitis amurensis* root, WEVA)이 지닌 항산화 효능을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법»»»

1. WEVA의 제조

머루근은 (주)대한생약제품(Busan, Korea)에서 건조된 상태로 구입하였으며, 수용성 추출물을 제조하기 위하여 분쇄한 머루근 500 g을 2 L의 증류수로 100 °C 조건에서 4시간 동안 환류 시스템(reflux system, Kyungseo E&P, Incheon, Korea)을 사용하여 수용성 성분을 추출하였다. 농축물을 얻기 위하여 용해되지 않은 잔류물을 여과지(Whatman No. 3 filter paper)를 통해 제거한 후, 진공 회전 증발기(vacuum rotary evaporator, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하고, 동결 건조기(freeze dryer, SP Industries, Inc., Warminster, PA, USA)를 이용하여 동결건조하였다. 획득된 고형성분(WEVA)은 4 °C에 보관하였으며, 세포에 처리하기 위하여 증류수에 적정 농도로 희석하였다.

2. 세포배양 및 WEVA의 처리

본 연구에 사용한 C2C12 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 배양기 조건을 37 °C 및 5% CO₂로 설정하여 10% (v/v)

fetal bovine serum와 1% (v/v) penicillin/streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (WelGENE, Inc., Gyeongsan, Korea) 배지를 이용하여 배양하였다. H₂O₂는 구입처는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)이며, phosphate-buffered saline (PBS)에 적정 농도로 희석하여 세포 처리용으로 사용하였다. H₂O₂에 의한 C2C12 세포의 세포독성에 미치는 WEVA의 보호 효과를 알아보기 위하여 C2C12 세포에 다양한 농도의 WEVA 또는 H₂O₂를 단독으로 24시간 동안 처리하거나, WEVA가 함유된 배지에서 세포를 1시간 배양 후 H₂O₂를 24시간 처리하였다. 아울러, ROS 생성 차단을 위한 양성 대조군으로 N-acetyl-l-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하였으며, heme oxygenase-1 (HO-1)의 선택적 저해제로는 zinc protoporphyrin (ZnPP, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA)를 사용하였다. NAC과 ZnPP를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)에 녹여 100 mg/mL의 농도(stock solution)로 만든 후 이를 세포배양 배지에 적정 농도로 희석하여 H₂O₂ 처리 1시간 전에 WEVA와 동시에 또는 단독으로 처리하였다.

3. 세포 생존율 분석

H₂O₂ 처리에 의한 C2C12 세포의 세포 독성 유발에 미치는 WEVA의 영향을 평가를 위해, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석법으로 다양한 조건에서 배양된 세포들을 대상으로 세포 생존율을 조사하였다. 이를 위하여 처리가 완료된 후, 0.5 mg/mL의 MTT (Thermo Fisher Scientific Inc.)가 함유된 배지로 교체하고 37 °C에서 반응시켰다. 3시간의 반응 후, DMSO를 사용하여 각 well에 형성된 formazan crystal을 10분간 용해시켰다. 이어서 반응액을 96 well plate에 200 µL씩 옮겨 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 마이크로플레이트 판독기(microplate reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)를 통해 540 nm의 파장에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 아래는 처리 조건에 따른 C2C12 세포의 세포 생존율을 대조군 기준으로 백분율로 나타낸 것이다.

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{OD_{treated}}{OD_{control}} \times 100$$

OD_{treated}: mean OD in WEVA and/or H₂O₂-treated cells, OD_{control}: mean OD in untreated cells

4. 세포사멸 유도의 정량적 평가

H₂O₂ 처리한 C2C12 세포의 세포사멸 유도에 WEVA가 미치는 영향을 조사하기 위하여 Annexin V apoptosis detection kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용한 유세포 분석을 수행하였다. 처리 완료된 세포를 0.05% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich Co.) 용액으로 부유시킨 후 5분간 2,000 rpm으로 원심분리하여 수집하였다. 제조사의 지침에 따라 처리가 완료된 세포를 kit에서 제공된 binding buffer로 부유시킨 후, annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide 용액을 처리해 암실에서 20분간 반응시켰다. 이어서 세포사멸이 유도된 세포(annexin V⁺/PI⁺)의 빈도를 유세포 분석기(Becton Dickinson)를 사용하여 형광 반응에 따라 분석하였다.

5. ROS 생성 측정

C2C12 세포에서 H₂O₂로 인한 ROS의 생성에 미치는 WEVA의 영향을 조사하기 위하여 형광 probe인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색을 적용하였다. 이를 위하여 WEVA (1.5 mg/mL)를 1시간 전처리한 후, H₂O₂ (1 mM)을 1시간 동안 추가 처리된 세포를 PBS로 세척하고 10 µM의 DCF-DA (Molecular Probes, Leiden, Netherlands)로 암실에서 30분 동안 염색하였다. 이후 non-specific staining을 제거하고자 PBS로 3회 세척 후 유세포 분석기를 이용하여 제조사의 지침에 따라 각 처리군당 ROS의 생성 정도를 측정하였다. 아울러 동일 조건에서 염색된 세포들의 DCF 형광 강도를 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에 관찰하였다.

6. 면역 형광 염색에 의한 DNA 손상 여부의 평가

WEVA가 H_2O_2 처리한 C2C12 세포의 DNA 손상에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위해 DNA의 손상 마커인 phosphorylated-H2A histone family member X (γ -H2AX, Ser139)의 발현 변화를 조사하였다. 이를 위해 WEVA를 1시간 동안 전처리하고 24시간 동안 H_2O_2 가 처리된 세포를 100% 메탄올로 10분 동안 $-20^\circ C$ 에서 고정시킨 후, PBS로 3번 세척하였다. 고정된 세포를 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Co.)가 함유된 0.1% Triton X-100 in PBS (PBS-T)에 1시간 상온에서 반응시키고 2.5% BSA로 희석한 γ -H2AX 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 첨가하여 $4^\circ C$ 에서 12시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS-T로 10분간 2회 세포를 세척하고, 상온에서 1% BSA로 희석한 2차 항체(Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific)를 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 PBS-T로 2회 10분간 세척한 후, 암실에 20분 동안 $2.5 \mu g/mL$ 의 4,6-diamidino-2-phenylindole (Sigma-Aldrich Co.) 용액을 이용해 핵을 추가로 염색하고, PBS-T로 세척하여 γ -H2AX의 발현 강도를 형광현미경 하에서 관찰하였다.

7. Comet 분석에 의한 DNA 손상 여부의 평가

H_2O_2 처리에 의한 C2C12 세포의 DNA 손상에 미치는 WEVA의 영향을 추가 조사하기 위해 comet 분석을 수행하였다. 이를 위하여 comet assay kit (Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA)를 사용하였으며, 제조사의 지침에 따라 세포를 용해시키고, DNA의 풀림을 허용한 후 전기영동을 분리하였다. 이어서 kit에서 제공된 SYBR Gold 용액으로 DNA를 염색하고 형광현미경을 사용하여 comet tail 이미지의 형성 여부를 관찰하였다.

8. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 함량 분석에 의한 DNA 손상 여부 조사

γ -H2AX 염색 및 comet 분석으로 확인된 H_2O_2 유도 C2C12 세포의 DNA 손상에 미치는 WEVA의 차단 효과

를 정량적으로 평가하기 위하여, 세포 내 산화적 손상에 의해 형성된 8-OHdG의 수준을 평가하였다. 이를 위하여, 배양액을 수거하여 8-OHdG ELISA kit (Biovision, K4160-100, Milpitas, CA, USA)를 사용해 정량적인 평가를 수행하였다.

9. 미토콘드리아 기능 손상 평가

C2C12 세포에서 H_2O_2 에 의한 산화적 손상이 미토콘드리아 기능 저하와 연관이 있는지와 이를 WEVA가 감소시킬 수 있는지를 조사하기 위하여 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1) 염색에 따른 미토콘드리아 막 전위(MMP, $\Delta\psi_m$)의 변화를 측정하였다. 이를 위하여 WEVA (1.5 mg/mL)가 포함된 배지에서 1시간 동안 배양한 다음, H_2O_2 (1 mM)를 24시간 처리한 세포들을 모아 PBS로 세척한 후, $10 \mu M$ 의 JC-1 (Sigma-Aldrich Co.)을 첨가해 $37^\circ C$ 에서 20분 동안 반응시켰다. 이어서 세포를 PBS로 다시 세척하고 제조사의 지침에 따라 유세포 분석기를 사용하여 MMP의 변화를 조사하였다.

10. 단백질 분리 및 western blot 분석

WEVA의 H_2O_2 유도 산화적 손상의 보호에 관여하는 관련 유전자들의 발현 변화를 확인하기 위해 처리가 끝난 세포를 모아서 PBS로 세척 후, radioimmunoprecipitation assay lysis buffer (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 총 단백질을 추출하거나, mitochondrial fractionation kit (Active Motif, Inc., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 세포질과 미토콘드리아 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 정량화한 후, 각 처리군별로 같은 양의 단백질을 sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane (Bedford, MA, USA)으로 전이시켰다. 단백질 전이된 막을 $4^\circ C$ 에서 검출 대상 1차 항체에 반응시킨 후, PBS로 세척하고, 1차 항체에 적절한 2차 항체 (horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 반응시켰다. 이어서

Table I. List of Antibodies Used for Western Blot Analysis in The Present Study

Antibody	Supplier	Item No.	Dilution
Cytochrome <i>c</i>	Cell Signaling Technology Inc.	#4272	1:500
Bax	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7480	1:1,000
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7382	1:1,000
Caspase-3	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7272	1:1,000
PARP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7150	1:1,000
Nrf2	Abcam, Inc.	ab137550	1:1,000
p-Nrf2	Abcam, Inc.	ab76026	1:500
HO-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-136960	1:1,000
Keap1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-365626	1:1,000
COX-IV	Cell Signaling Technology Inc.	#4844	1:1,000
Actin	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-1615	1:2,000
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005	1:1,500
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2004	1:1,500

Bax: Bcl-2-associated X protein, Bcl-2: B-cell lymphoma 2, Caspase-3: cysteine-aspartic protease 3, PARP: poly(ADP-ribose) polymerase, Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2, p-Nrf2: phosphorylated nuclear factor E2-related factor 2, HO-1: heme oxygenase-1, Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, COX-IV: cytochrome *c* oxidase subunit IV, Goat anti-rabbit IgG-HRP: goat anti-rabbit immunoglobulin G conjugated with horseradish peroxidase.

enhanced chemiluminescence 용액(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)과 Fusion FX imaging system (Vilber Lourmat, Torcy, France)을 이용하여 관찰 대상 단백질의 발현 정도를 검출하였다. 본 연구에 사용된 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc., Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA) 및 Abcam, Inc.에서 구입하였다(Table I).

11. Caspase-3 활성 평가

H₂O₂에 의한 C2C12 세포의 세포사멸 과정에 관여하는 caspase-3의 활성을 WEVA가 억제할 수 있는지를 평가하기 위해서 caspase-3 colorimetric assay kit (R&D Systems Inc.)를 사용하였다. 이를 위하여 각각의 처리 조건에서 배양된 세포를 모아 단백질을 분리한 후, 동일한 양의 단백질(150 µg)을 kit에서 제공된 reaction buffer와 혼합하고 caspases-3의 기질인 fluorogenic peptide인 Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline (*p*-NA)가 함유된 extraction buffer를 첨가하여 37 °C의 암실에서 제조사의 지침에 따라 반응시켰다. 2시간 동안 반응시킨 후, 기질에서 분해된 *p*-NA의 농도를 405 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 대조군의 파장 값

에 대한 상대적 비율로 제시하였다.

12. HO-1 활성의 분석

다양한 조건에서 배양된 C2C12 세포의 HO-1의 효소적 활성은 헴(heme)으로부터 생성되는 빌리루빈(bilirubin)의 양을 기준으로 측정하였다. 이를 위하여 처리가 완료된 세포들을 모아 HO-1 ELISA kit (Abcam, Inc.)의 지침에 따라 각 샘플의 상청액에 reaction mixture를 첨가하고 37 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어서 제조사의 지침에 따라 빌리루빈을 추출하고 464와 530 nm 사이의 흡광도 차이를 ELISA reader로 측정하여 형성된 빌리루빈의 양을 대조군 대비 상대치로 제시하였다.

13. 통계 처리

실험 결과의 통계적 유의성 분석은 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 Tukey 사후 테스트로 수행하였다. 모든 결과는 최소 세 번의 독립적인 실험에서 평균±표준편차(standard deviation)로 제시하였고, $p < 0.05$ 의 값을 통계적 유의미한 차이를 나타내는 것으로 간주하였다.

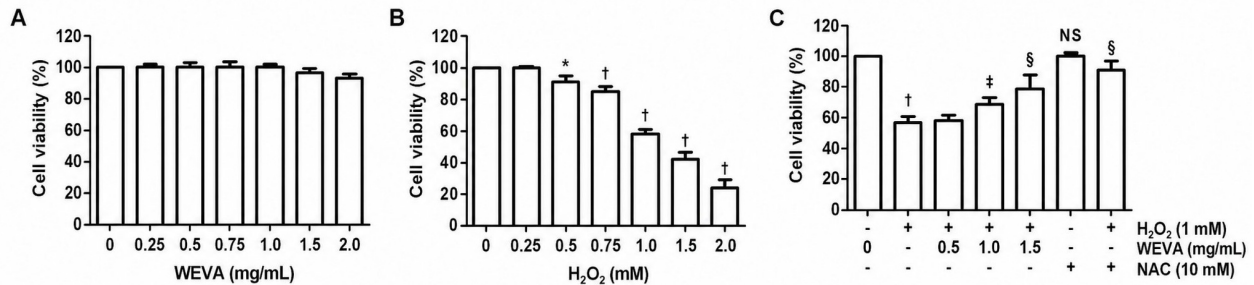


Fig. 1. Protective effect of WEVA against H₂O₂-induced reduction in cell viability in C2C12 cells. (A) Effect of WEVA alone on the cell viability of C2C12 cells. (B) Effect of H₂O₂ alone on the cell viability of C2C12 cells. (C) Protective effect of WEVA against H₂O₂-induced cytotoxicity. WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, NAC: N-acetyl-L-cysteine. *p<0.05 and †p<0.001 compared with the control group; ‡p<0.05 and §p<0.001 compared with the H₂O₂-treated group; NS, not significant compared with the control group.

결과»»»»

1. C2C12 세포의 증식에 미치는 WEVA 및 H₂O₂의 영향

서로 다른 농도의 WEVA와 H₂O₂가 함유된 배지에 24시간 동안 배양한 후, MTT 분석에 의한 세포 생존율을 조사하였다. Fig. 1A에 제시된 결과에서 알 수 있듯이, WEVA의 최고 처리 농도인 2.0 mg/mL 처리군에서 다소 세포 생존율이 감소하였으나, 대조군과 비교하였을 때 유의적인 결과는 관찰되지 않았다. 그러나 H₂O₂에 노출된 C2C12 세포는 H₂O₂의 처리 농도 증가에 따라 점차 세포 생존율이 유의적으로 감소하였으며(Fig. 1B), 1 mM 및 2 mM의 H₂O₂가 처리된 경우, 대조군 대비 약 60% 및 22% 정도의 세포 생존율을 나타내었다. 이들 MTT 분석 결과에 준하여, C2C12 세포에 산화적 스트레스 유발을 위한 H₂O₂의 처리 농도는 1 mM로 설정하였다. 그리고 H₂O₂의 세포독성에 미치는 WEVA의 영향을 조사하기 위해서는 1.5 mg/mL를 최고 농도로 설정하여 전처리하였다.

2. C2C12 세포에서 H₂O₂에 의한 세포 생존율 억제에 미치는 WEVA의 영향

0.5 mg/mL의 WEVA가 전처리된 조건에서는 H₂O₂에 의해 억제된 세포 생존율에 유의적인 변화가 없었지만, 1

mg/mL 및 1.5 mg/mL의 WEVA가 존재하는 조건에서는 세포 생존율이 전처리 농도 의존적으로 회복되었다(Fig. 1C). 또한 양성 대조군으로 ROS 생성 저해제인 NAC^{18,19}를 10 mM 전처리 후 1 mM의 H₂O₂를 처리하였을 경우, 대조군 대비 90% 정도의 세포 생존율을 보여주었다.

3. C2C12 세포에서 H₂O₂에 의한 세포사멸 유도에 미치는 WEVA의 영향

H₂O₂가 단독 처리된 C2C12 세포에서의 세포사멸 유도는 대조군(3.5%)에 비하여 약 8.5배(29.4%) 증가되었으며, WEVA 단독 처리군(4.9%)에서는 대조군과 유사한 수준이었다. 그러나 WEVA가 존재하는 조건에서 H₂O₂에 노출된 세포에서의 세포사멸은 약 19.3%로 나타나 양성 대조군 NAC 전처리군(13.5%) 보다는 낮았지만, WEVA는 H₂O₂에 의한 C2C12 세포의 세포사멸을 억제하였다(Fig. 2).

4. C2C12 세포에서 H₂O₂ 처리에 의한 ROS 생성에 미치는 WEVA의 영향

DCF-DA 염색에 따른 유세포 분석 결과(Fig. 2B)에 의하면, 대조군(3.1%)에 비하여 H₂O₂가 처리된 세포에서 ROS의 생성량은 9배 이상(29.7%) 증가하였으나, WEVA가 존재하는 조건에서는 H₂O₂ 처리군에 비하여 약 22% 수준(6.5%)으로 현저하게 감소하였다. 아울러 양성 대조군인 NAC 전처리군에서는 H₂O₂ 처리에 의한 ROS 생성

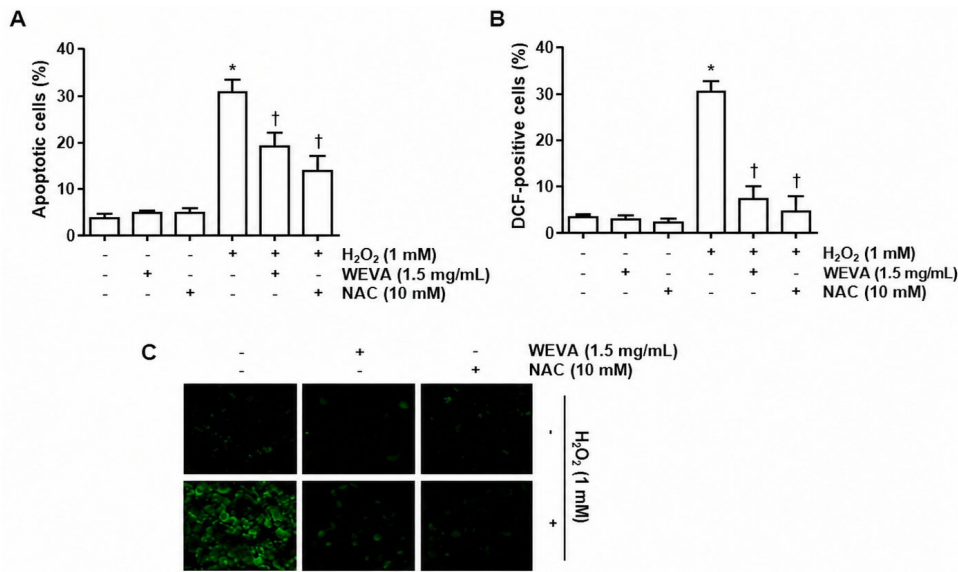


Fig. 2. Suppressive effect of WEVA on H₂O₂-induced apoptosis and ROS generation in C2C12 cells. (A) Suppression of H₂O₂-induced cell apoptosis. (B) Inhibition of intracellular ROS generation. (C) Representative fluorescence images of DCF staining. WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, ROS: reactive oxygen species, NAC: N-acetyl-L-cysteine. *p<0.001 compared with the control group; †p<0.001 compared with the H₂O₂-treated group.

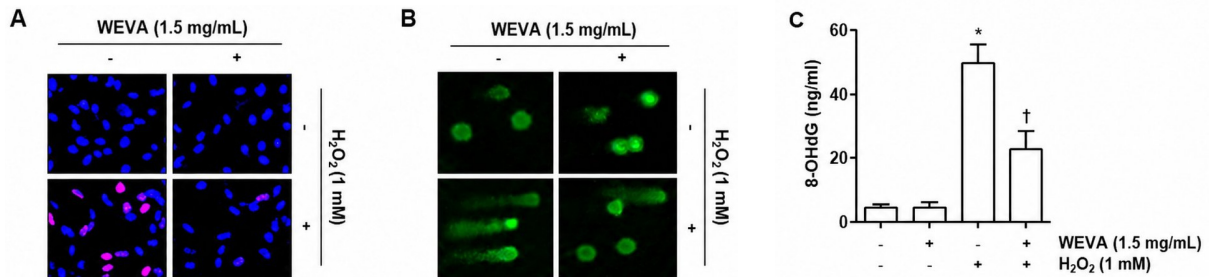


Fig. 3. Attenuation of H₂O₂-induced DNA damage by WEVA in C2C12 cells. (A) Immunofluorescence staining of γH2AX. (B) Comet assay for DNA damage analysis. (C) Measurement of 8-OHdG levels. WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, 8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *p<0.001 compared with the control group; †p<0.001 compared with the H₂O₂-treated group.

을 대조군 수준으로 차단하였다. 이러한 WEVA의 강력한 항산화 활성을 재확인하기 위하여 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 형광현미경 하에서 DCF 형광 강도를 비교하였으며, H₂O₂가 단독 처리된 세포에서 ROS 생성을 의미하는 형광 강도가 강하게 발현되었지만, NAC뿐만 아니라 WEVA가 존재하는 조건에서 배양된 세포에서는 그 형광 강도가 감소하였다(Fig. 2C).

5. H₂O₂에 의한 C2C12 세포의 DNA 손상에 미치는 WEVA의 영향

1.5 mg/mL의 WEVA가 함유된 배지에 1시간 배양된 C2C12 세포에 1 mM의 H₂O₂를 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 대표적인 DNA 손상 마커인 γ-H2AX^{20,21}의 발현에 미치는 WEVA의 영향을 조사한 결과(Fig. 3A), 대조군 또는 WEVA 단독 처리군에 비하여 H₂O₂가 처리된 C2C12 세포의 핵에서는 γ-H2AX의 발현이 증가되었지만, WEVA가 전처리되었을 경우, γ

-H2AX 양성 핵의 빈도뿐만 아니라 형광 강도 또한 억제되었다. 그리고 단일 세포 젤 전기영동(single cell gel electrophoresis)에 의한 개별 세포에서 DNA 가닥 파손을 측정하는 comet 분석을 한 결과^{22,23)}(Fig. 3B), 대조군 또는 WEVA 단독 처리군에 비하여 H₂O₂가 단독 처리된 C2C12 세포에서 DNA 손상을 의미하는 comet tail의 형성이 관찰되는 반면, WEVA가 존재하는 조건에서 H₂O₂가 처리된 세포에서는 comet tail의 길이가 현저하게 짧아지거나 형성되지 않았다. 아울러 8-OHdG는 자유 라디칼 유도 산화 병변의 주된 형태 중 하나로서 대표적인 산화적 DNA 손상의 주요 바이오마커이며^{24,25)}, H₂O₂가 단독 처리된 C2C12 세포에서 대조군 또는 WEVA가 단독처리된 세포에 비하여 8-OHdG의 수준이 증가하였으나, WEVA는 H₂O₂에 의한 8-OHdG의 생성을 억제하였다(Fig. 3C).

6. H₂O₂에 의한 C2C12 세포의 미토콘드리아 기능 소실에 미치는 WEVA의 영향

대조군 또는 WEVA가 단독 처리된 C2C12 세포에 비

하여 H₂O₂가 단독 처리된 세포에 MMP의 소실이 급격하게 증가하였으나, WEVA는 이를 유의적으로 억제하였다. 또한 H₂O₂가 처리된 C2C12 세포의 미토콘드리아 분획에서는 cytochrome *c*의 발현이 억제된 반면, 세포질 분획에서의 발현은 증가되었다(Fig. 4B, C). 이는 H₂O₂ 처리에 의하여 MMP의 소실에 따른 결과이며, WEVA의 전처리는 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome *c*의 이동을 유의적으로 차단하였다. 이 결과는 WEVA에 의하여 미토콘드리아 기능 손상이 차단되었기 때문에 나타난 현상이다.

7. H₂O₂가 처리된 C2C12 세포에서 세포사멸 조절 인자들의 발현 변화에 미치는 WEVA의 영향

WEVA에 의한 MMP의 소실 차단이 이들 단백질의 발현 변화와 연관성이 있는지를 조사하였다(Fig. 5A, B). Bax의 발현이 H₂O₂가 처리된 C2C12 세포에서 다소 증가되었으나, Bcl-2의 발현은 감소하였다. 그러나 WEVA가 존재하는 조건에서 H₂O₂가 처리된 세포에서는 이들 두 단백질의 발현이 대조군 수준으로 유지되었

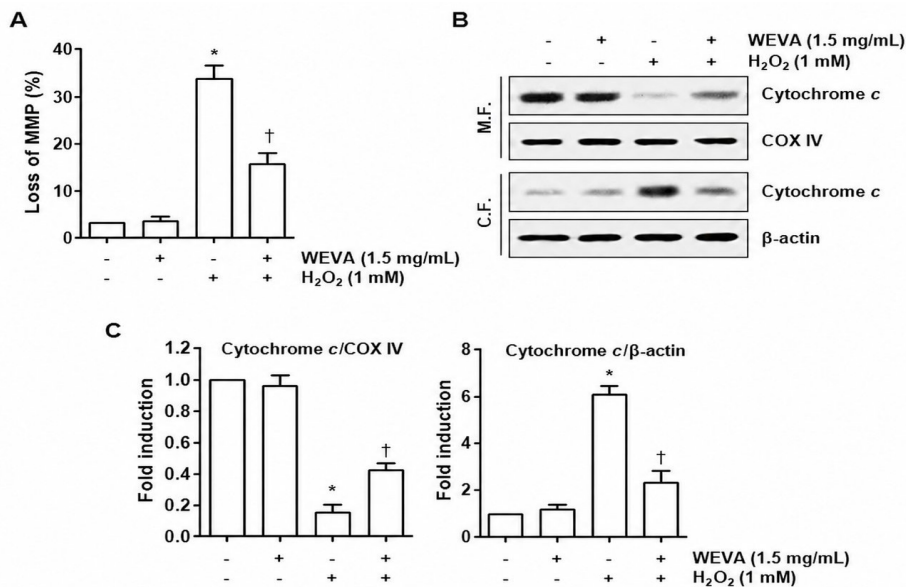


Fig. 4. Protection of H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction by WEVA in C2C12 cells. (A) Attenuating effect of WEVA on H₂O₂-induced loss of MMP. (B) Inhibitory effect of WEVA on H₂O₂-induced mitochondrial release of cytochrome *c*. (C) Suppression of H₂O₂-induced cytochrome *c* translocation by WEVA. WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, MMP: mitochondrial membrane potential, C.F: cytosolic fraction, M.F: mitochondrial fraction, COX IV: cytochrome *c* oxidase subunit IV. *p<0.001 compared with the control group; †p<0.001 compared with the H₂O₂-treated group.

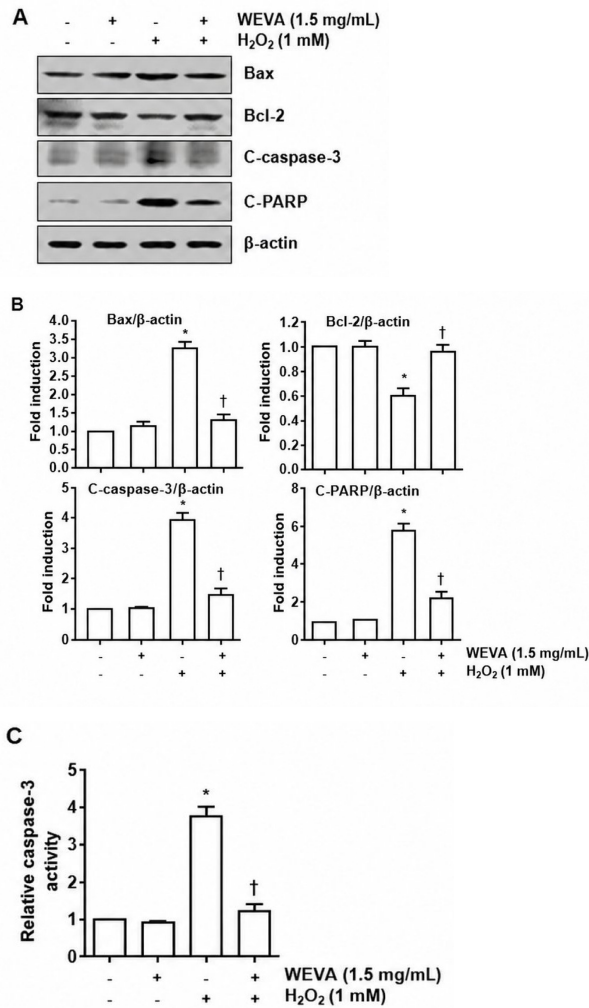


Fig. 5. Effects of WEVA on the expression of apoptosis regulatory proteins and activity of caspase-3 in H_2O_2 -treated C2C12 cells. (A) Western blot analysis of apoptosis-regulatory proteins. (B) Relative protein expression levels normalized to β -actin. (C) Effect of WEVA on caspase-3 activation. WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, Bax: Bcl-2-associated X protein, Bcl-2: B-cell lymphoma 2, PARP: poly(ADP-ribose) polymerase. *p<0.001 compared with the control group; †p<0.001 compared with the H_2O_2 -treated group.

다(Fig. 5A, B). H_2O_2 가 처리된 C2C12 세포에서 caspase-3은 대조군에 비하여 약 3.7배 이상 활성이 증가되었지만, WEVA가 존재할 경우 대조군 수준으로 유지되었다(Fig. 5C). 아울러 H_2O_2 처리된 세포에서 증가된 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 단편화(cleaved PARP)의 발현 또한 WEVA 전처리에 의하여 유의적으로 감소되었다(Fig. 5A, B).

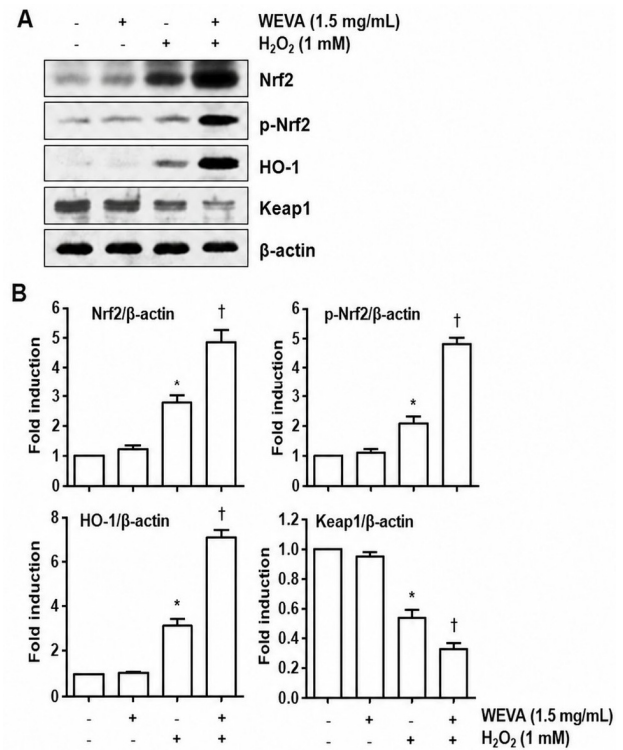


Fig. 6. Activation of Nrf2 signaling pathway by WEVA in H_2O_2 -treated C2C12 cells. (A) Western blot analysis of Nrf2 signaling pathway proteins. (B) Densitometric quantification of protein expression levels. Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2, WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, HO-1: heme oxygenase-1, Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1. *p<0.001 compared with the control group; †p<0.001 compared with the H_2O_2 -treated group.

8. H_2O_2 가 처리된 C2C12 세포에서 WEVA에 의한 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) 신호계의 활성화

WEVA가 단독 처리된 C2C12 세포에 Nrf2의 발현은 대조군에 비하여 유의적인 변화가 없었지만, H_2O_2 가 처리된 세포에서는 다소 증가된 경향을 보여주었다(Fig. 6). 그러나 WEVA와 H_2O_2 가 동시에 처리된 세포에서의 Nrf2의 발현은 H_2O_2 단독 처리된 세포에 비하여 증가되었으며, Nrf2의 활성형을 의미하는 인산화형 Nrf2 (phosphorylated-Nrf2)의 발현도 유사한 경향성을 보여주었다. 아울러 Nrf2에 의해 조절되는 단백질의 하나로써 강력한 항산화 활성을 가지는 HO-1의 발현 또한 Nrf2 발현 양상과 유사한 반면, Nrf2의 억제자로 작용

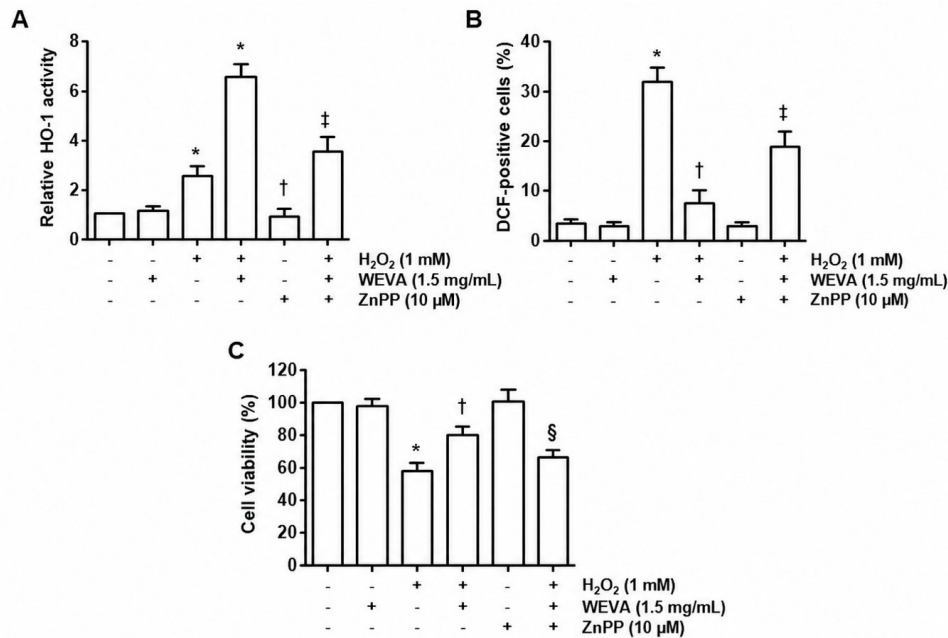


Fig. 7. Effect of Nrf2/HO-1 signaling pathway on antioxidant activity of WEVA in C2C12 cells. (A) Measurement of relative HO-1 activity. (B) Flow cytometric analysis of ROS production. (C) Assessment of cell viability by MTT assay. Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2, HO-1: heme oxygenase-1, WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, ZnPP: zinc protoporphyrin, DCF: dichlorodihydrofluorescein. *p<0.001 compared with the control group; †p<0.001 compared with the H₂O₂-treated group; ‡p<0.01 and §p<0.001 compared with the H₂O₂+WEVA-treated group.

하는 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)의 발현은 이들과 정반대의 경향성을 보여주었다.

9. H₂O₂가 처리된 C2C12 세포에서 WEVA의 항산화 활성에 미치는 HO-1의 영향

다양한 배양 조건에서 HO-1 활성을 분석한 결과, 대조군 대비 H₂O₂ 단독 처리군에서 약 2.5배의 활성 증가가 관찰되었다. 나아가 WEVA와 H₂O₂를 혼합 처리한 군에서는 HO-1 활성이 약 6.3배까지 상승하였다(Fig. 7A). 반면 HO-1 억제제인 ZnPP를 처리했을 때, WEVA와 H₂O₂ 병용에 의한 HO-1 활성 증가가 감소했다. 이와 함께 H₂O₂로 유도된 ROS 생성을 차단하던 WEVA의 효과 역시 ZnPP에 의해 유의미하게 억제되었으며(Fig. 7B), H₂O₂ 유발 세포 독성에 대한 WEVA의 보호 효능 또한 HO-1 활성이 차단됨에 따라 소실되었다(Fig. 7C).

고찰»»»»

본 연구의 결과에 의하면, WEVA는 C2C12 세포에서 H₂O₂로 유도된 세포 생존력 감소를 유의적으로 차단하였다. WEVA는 또한 H₂O₂로 인한 DNA 손상을 차단할 수 있었으며, 이는 DNA 이중 가닥 파손의 특징인 γ H2AX 발현 및 comet tail 형성의 억제²⁰⁻²³⁾와 핵산의 산화 스트레스에 널리 사용되는 바이오마커인 8-OHdG의 수준^{24,25)}의 감소로 확인하였다.

또한 본 연구에서 WEVA가 골격근 세포의 산화적 손상을 효과적으로 완화시킬 수 있는지 알아보기 위해 C2C12 세포와 전형적인 산화적 스트레스 모델링 방법인 H₂O₂ 자극을 사용하였다. 대표적 ROS인 H₂O₂는 세포 내에서 분해되어 반응성이 매우 강한 수산화 라디칼(hydroxyl radical)을 생성한다. 이는 DNA 손상을 유발하여 최종적으로 근육 세포의 사멸을 초래한다^{26,27)}. 따라서 잠재적인 항산화제는 근육 세포에 대한 ROS 매개 손상에 대한 보호 효과뿐만 아니라 치료 효과를 가질 수 있다. 본 연구의 결과는 WEVA가 C2C12 세포에서

ROS 생산의 억제를 통해 H_2O_2 유발 세포 독성을 효과적으로 감소시켰음을 보여주었으며, 이 과정에 Nrf2/HO-1 신호 전달계의 활성이 관여하고 있었다(Fig. 8). 아울러, 이전 연구 결과와 일치되게, H_2O_2 에 노출된 C2C12 세포에서 세포사멸 유도 세포의 빈도를 증가시켰고, MMP의 손실과 ROS의 축적을 유도하였다²⁸⁻³⁰. 산화적 스트레스로 인한 ROS의 비정상적 축적은 미토콘드리아 막의 탈분극에 기여하여 미토콘드리아 손상을 나타내는 MMP 손실을 초래한다^{31,32}. MMP의 감소는 세포질로의 cytochrome *c* 방출을 유도한다. 이는 caspase cascade를 자극하여 미토콘드리아 매개 내인성 세포사멸을 활성화하며, 최종적으로 PARP 같은 표적 단백질을 분해함으로써 세포 사멸을 완성한다^{33,34}. 또한, 내인성 세포사멸은 Bcl-2 family 단백질에 의해 정밀하게 조절된다. Pro-apoptotic 인자인 Bax는 미토콘드리아 기공(mitochondrial pores)을 형성해 미토콘드리아 막 장벽 안정성(mitochondrial membrane barrier stability)을 무너뜨리는 반면, anti-apoptotic 인자인 Bcl-2는 이를 억제한다. 따라서 Bax 대비 Bcl-2의 발현 비율이 감소하면 미토콘드리아 막 투과성이 높아져 cytochrome *c*의 방출이 유도된다^{32,34}. 이전 결과와 유사하게 본 연구에서도 H_2O_2 를 처리한 C2C12 세포에서 세포질로의 cytochrome *c* 방출, Bax/Bcl-2 발현 비율

의 증가, caspase-3 활성화에 의한 PARP의 절단이 관찰되었다^{29,35,36}. 그러나 이러한 H_2O_2 유발 세포독성 및 사멸 효과는 WEVA의 존재 하에서 모두 유의적으로 억제되었다. 이는 WEVA가 H_2O_2 에 의한 과도한 ROS 생성을 차단하여 MMP를 회복시키고, 궁극적으로 caspase-3 의존성 내인성 세포사멸 경로를 차단함으로써 근원세포를 보호할 수 있음을 보여준다.

정상적인 생리적 조건 하에서 Nrf2는 세포질 내 억제 인자인 Keap1과 복합체를 형성하고 있으며, 유비퀴틴-프로테아좀 경로(ubiquitin proteasome pathway)에 의해 지속적으로 분해된다. 그러나 Nrf2가 핵 내로 이동하여 antioxidant response element (ARE)에 결합하고 하위 타겟 유전자들의 전사를 유도하기 위해서는, Keap1로부터의 해리가 선행되어야 하며 핵 전위를 위한 인산화 과정이 필수적이다³⁷. Nrf2 의존적 항산화 효소 중 ARE 서열에 의해 전사 수준에서 조절되는 HO-1은 헴(heme)의 분해 작용을 촉진하여 일산화탄소(carbon monoxide), 자유 철(free iron), 그리고 빌리베르딘(biliverdin)을 생성한다. 이 중 빌리베르딘은 후속 반응을 통해 빌리루빈(bilirubin)으로 대사되며, 이 최종 대사물이 생체 내에서 강력한 항산화 효과를 나타내게 된다³⁷.

본 연구 결과에서는 WEVA가 존재하는 조건에서 산화적 스트레스에 노출된 C2C12 세포에서 Nrf2의 발현 및 인산화의 증가와 Keap1의 발현 억제에 따라 HO-1의 전사 활성을 촉진시켜 Nrf2/HO-1 신호 전달 경로가 활성화되었음을 의미한다. 따라서 Nrf2/HO-1 신호계의 활성이 WEVA의 항산화 활성에 직접 관여하였는지를 조사하기 위하여 HO-1 억제제인 ZnPP를 사용한 후속 실험에서, H_2O_2 에 노출된 C2C12 세포의 ROS 생성 및 세포 독성을 억제하는 WEVA의 효능은 크게 약화되었으며, 이는 HO-1 활성화가 WEVA에 의한 H_2O_2 유발 산화적 손상의 억제에 크게 관여하였음을 나타내는 결과이다(Fig. 8).

높은 산화적 스트레스 환경에 노출된 근원세포는 DNA 손상, 세포 노화 및 세포사멸에 대한 방어에 취약하며 항산화 능력의 손실은 근 위축을 비롯한 퇴행성 근육 질환의 근간이 될 수 있다⁶. 또한 증가된 ROS 축적에 따른 산화 스트레스는 근육 단백질 분해를 촉진하여 근육 위축에 따른 근 손상을 일으키게 된다^{7,8}. 이러한 근 위축과 같은 근 손상은 한의학적으로 痿症에 해

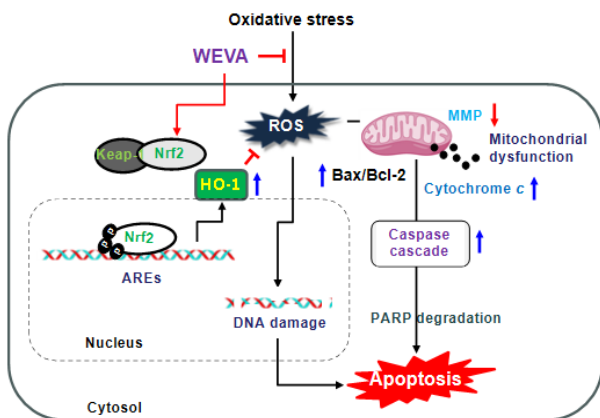


Fig. 8. Schematic diagram showing the proposed mechanism underlying protective potential of WEVA against oxidative stress-induced oxidative cytotoxicity in C2C12 myoblasts. WEVA: water extract of *Vitis amurensis* root, ROS: reactive oxygen species, Keap-1: Kelch-like ECH-associated protein 1, Nrf2: nuclear factor E2-related factor 2, AREs: antioxidant response element, HO-1: heme oxygenase-1, MMP: mitochondrial membrane potential, Bax/Bcl-2: Bcl-2-associated X protein/B-cell lymphoma 2, PARP: poly(ADP-ribose) polymerase.

당된다고 볼 수 있다.痿症은 인체가 손상을 입거나 혹은 정기가 훼손된 후에 邪毒이 침습하여 나타나는 肢體筋脈弛緩, 軟弱無力, 手不能握物, 足不能任身, 久則肌肉萎縮, 不能隨意運動 등의 증상을 가리킨다³⁸⁾. 머루근은 과거부터 하지 근육 질환 치료에 일부 사용되고 있는데, 한의학에서 머루근은 태양인 외감요척병인 해역증을 치료하는 대표적인 약인 오가피장척탕의 구성 약제이다. 동의수세보원에서는 해역증은 弱不弱 壯不壯 寒不寒 熱不熱라 하여, 상체는完건하나 하체는마비나 종통이 없고 힘이 약한 것은 아니나 걸을 수가 없는 상태로 오가피장척탕을 투여하여야 한다고 하였다³⁹⁾. 이러한 해역증의 증상은 한의학적인痿症의 병태생리와 비슷하다고 할 수 있다⁴⁰⁾. 종합하면, 본 연구에서 WEVA가 C2C12 근원세포에서 미토콘드리아 기능 장애를 완화하기 위해 ROS 항상성을 조절함으로써 DNA 손상 및 세포사멸과 같은 산화적 스트레스 유도 세포 독성을 억제할 수 있음을 입증하였다. 또한, WEVA는 Nrf2/HO-1 신호계의 활성을 강화하여 산화적 손상의 차단에 기여할 수 있는데, 이는 아마도 산화적 스트레스로 유도된 ROS 축적이 HO-1 활성화에 의해 억제되었기 때문이다. 이러한 결과는 해역증 등 하지 근육 약화 질환에 사용되어 온 머루근이 산화적 손상 관련 근육 질환의 예방과 치료에도 의미있게 활용될 수 있는 있는 잠재력이 있음을 시사한다.

비록, 본 연구의 결과는 WEVA가 Nrf2의 활성화제로 작용하여 HO-1 발현을 증가시켜 C2C12 세포에서 산화적 스트레스로 유도된 세포 독성의 차단에 기여하였음을 시사하지만, WEVA에 함유된 생리활성 물질의 탐색과 Nrf2의 인산화에 관여하는 상위 신호계의 규명 및 동물 모델에서의 효능 평가를 위한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

결론»»»

머루근의 수용성 추출물(WEVA)이 근원세포인 C2C12 세포에서 과산화수소(H_2O_2)로 인한 산화적 손상을 예방할 수 있는지를 평가한 결과는 다음과 같다.

1. WEVA는 ROS 생성의 차단을 통하여 H_2O_2 로 인한

C2C12 세포의 세포 생존력 감소와 DNA 손상을 억제시켰다.

2. WEVA는 또한 H_2O_2 가 처리된 C2C12 세포에서 Bcl-2/Bax 단백질 발현의 비율을 증가시키고 caspase-3 활성화를 감소시키며 PARP의 절단을 차단함으로써 H_2O_2 에 의한 세포사멸로부터 C2C12 세포를 보호하였다.
3. WEVA는 cytochrome c가 미토콘드리아에서 세포질로 방출되는 것을 억제하였는데, 이는 미토콘드리아 막 안전성을 유지함으로써 억제할 수 있었던 것으로 추측된다.
4. WEVA는 Nrf2의 인산화 및 HO-1의 발현과 활성을 증가시켰지만, WEVA의 ROS 생성 억제 및 세포 독성 차단 효과는 HO-1 억제제에 의해 유의적으로 억제되었으며, 이는 WEVA이 Nrf2 매개 HO-1 활성을 촉진하여 C2C12 세포에서 산화적 손상을 방지하였음을 의미한다.

따라서 본 연구의 결과는 Nrf2 활성화제로서 WEVA는 ROS 소거능을 가지며 산화적 스트레스 매개 근육 손상을 보호할 수 있는 잠재력이 있음을 시사한다.

References»»»

1. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Interactions between reactive oxygen species and autophagy: special issue: death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2021;1868(8):119041.
2. Szarka A, Lőrincz T, Hajdinák P. Friend or foe: the reactivity of (anti)oxidative agents and pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(9):5188.
3. Brillo V, Chiericato L, Leanza L, Muccioli S, Costa R. Mitochondrial dynamics, ROS, and cell signaling: a blended overview. *Life*. 2021;11(4):332.
4. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2020;48(284):124-7.
5. Bouviere J, Fortunato RS, Dupuy C, Werneck-de-Castro JP, Carvalho DP, Louzada RA. Exercise-stimulated ROS sensitive signaling pathways in skeletal muscle.

- Antioxidants. 2021;10(4):537.
6. Mosca N, Petrillo S, Bortolani S, Monforte M, Ricci E, Piemonte F, Tasca G. Redox homeostasis in muscular dystrophies. *Cells*. 2021;10(6):1364.
 7. Hyatt H, Deminice R, Yoshihara T, Powers SK. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: a review of the causes and effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2019;662:49-60.
 8. Powers SK, Ozdemir M, Hyatt H. Redox control of proteolysis during inactivity-induced skeletal muscle atrophy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2020;33(8):559-69.
 9. Chen Q, Diao L, Song H, Zhu X. *Vitis amurens* Rupr: a review of chemistry and pharmacology. *Phytomedicine*. 2018;49:111-22.
 10. Huang KS, Lin M. Oligostilbenes from the roots of *Vitis amurens*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 1999;2(1):21-8.
 11. Zhang WY, Li CS. Prevention methods against the precipitate in amur grape wine. *Liquor-Making Science & Technology*. 2000;6:74-5.
 12. Bak MJ, Jun M, Jeong WS. Procyanidins from wild grape (*Vitis amurens*) seeds regulate ARE-mediated enzyme expression via Nrf2 coupled with p38 and PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(1):801-18.
 13. Bak MJ, Truong VL, Ko SY, Nguyen XN, Ingkasupart P, Jun M, Shin JY, Jeong WS. Antioxidant and hepatoprotective effects of procyanidins from wild grape (*Vitis amurens*) seeds in ethanol-induced cells and rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(5):758.
 14. Ha do T, Kim H, Thuong PT, Ngoc TM, Lee I, Hung ND, Bae K. Antioxidant and lipoxigenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;125(2):304-9.
 15. Wang JN, Chen YJ, Hano Y, Nomura T, Tan RX. Antioxidant activity of polyphenols from seeds of *Vitis amurens* in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2000;21(7):633-6.
 16. Weidner S, Powalka A, Karamać M, Amarowicz R. Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines-comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(3):3444-57.
 17. Choi EO, Kwon DH, Hwang-Bo H, Jeong JW, Nam WS, Lee YH, Yang HK, Hwang HJ, Kim BW, Lee SH, Choi YH. Cytoprotective effect of water extract of *Vitis amurens* root against oxidative stress in HaCaT human keratinocytes. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2018;47(1):15-23.
 18. Mlejnek P. Direct interaction between N-acetylcysteine and cytotoxic electrophile-an overlooked in vitro mechanism of protection. *Antioxidants*. 2022;11(8):1485.
 19. Pedre B, Barayeu U, Ezeriņa D, Dick TP. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): the emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacology & Therapeutics*. 2021;228:107916.
 20. Oberdoerffer P, Miller KM. Histone H2A variants: diversifying chromatin to ensure genome integrity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2023;135:59-72.
 21. Schütz CS, Stope MB, Bekeschus S. H2A.X phosphorylation in oxidative stress and risk assessment in plasma medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:2060986.
 22. Cordelli E, Bignami M, Pacchierotti F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*. 2021;10(1):68-78.
 23. Mišić M, Staudinger M, Kundi M, Worel N, Nersesyan A, Ferk F, Dusinska M, Azqueta A, Möller P, Knasmueller S. Use of the single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA-protective dietary factors: results of human intervention studies. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2023;791:108458.
 24. Chiorcea-Paquim AM. 8-Oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine biomarkers of oxidative DNA damage: a review on HPLC-ECD determination. *Molecules*. 2022;27(5):1620.
 25. Hahm JY, Park J, Jang ES, Chi SW. 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Experimental & Molecular Medicine*. 2022;54(10):1626-42.
 26. Cobley JN, Margaritelis NV, Morton JP, Close GL, Nikolaidis MG, Malone JK. The basic chemistry of exercise-induced DNA oxidation: oxidative damage, redox signaling, and their interplay. *Frontiers in Physiology*. 2015;6:182.
 27. Vara D, Pula G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Current Molecular Medicine*. 2014;14(9):1103-25.
 28. Moradi F, Fiocchetti M, Marino M, Moffatt C, Stuart JA. Media composition and O₂ levels determine effects of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators on mitochondrial bioenergetics and cellular reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021;321(1):C72-81.
 29. Park C, Ji SY, Lee H, Choi SH, Kwon CY, Kim SY, Lee ET, Choo ST, Kim GY, Choi YH, Kim MR. Mori Ramulus suppresses hydrogen peroxide-induced oxidative damage in murine myoblast C2C12 cells through activation of AMPK. *International Journal of Molecular*

- Sciences. 2021;22(21):11729.
30. Wei ZJ, Sun L, Li YL, Muhammad JS, Wang Y, Feng QW, Zhang YZ, Inadera H, Cui ZG, Wu CA. Low-calorie sweetener D-psicose promotes hydrogen peroxide-mediated apoptosis in C2C12 myogenic cells favoring skeletal muscle cell injury. *Molecular Medicine Reports*. 2021;24(1):536.
31. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(2):85-100.
32. Tiwari S, Dewry RK, Srivastava R, Nath S, Mohanty TK. Targeted antioxidant delivery modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation. *Theriogenology*. 2022;179:22-31.
33. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biology*. 2016;37(7):8471-86.
34. Popgeorgiev N, Jabbour L, Gillet G. Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 family of proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018;6:13.
35. Siu PM, Wang Y, Alway SE. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sciences*. 2009;84(13-14):468-81.
36. Yin Y, Lu L, Wang D, Shi Y, Wang M, Huang Y, Chen D, Deng C, Chen J, Lv P, Wang Y, Li C, Wei LB. Astragalus polysaccharide inhibits autophagy and apoptosis from peroxide-induced injury in C2C12 myoblasts. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2015;73(2):433-9.
37. Fetoni AR, Paciello F, Rolesi R, Paludetti G, Troiani D. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: oxidative stress and ROS signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;135:46-59.
38. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. *Korean rehabilitation medicine*. 5th ed. Seoul:Koonja Publishing Inc. 2015:173-4.
39. Oh JY, Kim WY, Lim EC. A case-report of a Taeyangin patient with acute motor axonal neuropathy using Ogapijangchuk-tang. *Journal of Sasang Constitution and Immune Medicine*. 2021;33(3):171-80.
40. Kim SH, Lee MS, Park YG, Bea NY. A case study of a Taeyangin patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Sasang Constitution and Immune Medicine*. 2016;28(3):300-8.